

## Dosage rapide des alditol-acétates par chromatographie en phase gazeuse

### Application à l'analyse des polysaccharides des parois cellulaires des fibres de cotonnier

M. G. Taha \*, C. Marquie et J. Bourelly \*\*

\* Maître assistant, Faculté d'Agronomie, Université d'Alazher, Le Caire (Egypte).

\*\* Laboratoire de chimie des plantes textiles de l'I.R.C.T./C.I.R.A.D., B.P. 5035, Montpellier Cedex.

#### RÉSUMÉ

Une nouvelle méthode rapide est décrite pour préparer et doser les alditol-acétates par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire. Elle est, en particulier, bien adaptée à l'analyse des aldoses, après hydrolyse acide des polysaccharides des parois cellulaires des fibres du cotonnier (*Gossypium barbadense* L.). Les aldoses (monosaccharides) sont réduits par le borohydrure de sodium dans une solution ammoniacale. Les alditols, ainsi formés, sont acétylés par le 1-méthylimidazole et l'anhydride acétique, pen-

dant 10 mn à la température ambiante. Les alditol-acétates sont ensuite séparés et dosés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire imprégnée de Carbowax 20 M. Cette méthode donne des résultats tout à fait comparables à ceux fournis par les méthodes classiques qui utilisent des colonnes remplies d'ECNSS-M ou de SP 2340 sur Chromosorb Q. Elle offre, sur ces dernières, l'avantage d'être beaucoup plus rapide, plus efficace et plus sélective.

MOTS CLES : parois, polysaccharides, coton, alditol-acétates.

#### INTRODUCTION

Pour doser un grand nombre de substances, la chromatographie en phase gazeuse utilise de plus en plus des colonnes capillaires, en remplacement des colonnes remplies. Par rapport aux colonnes remplies traditionnelles, elles présentent en effet les nombreux avantages suivants : meilleure efficacité ; meilleure sélectivité ; temps de rétention moindre des solutés ; volume d'échantillon injecté très petit. En outre, dans les laboratoires de recherches qui effectuent souvent des analyses très diverses, le fait de pouvoir toujours utiliser le même type de colonne pour réaliser des dosages de substances de nature très différente présente un grand intérêt. C'est la raison pour laquelle nous avons

été amenés à effectuer le dosage des alditol-acétates sur colonne capillaire imprégnée de Carbowax 20 M. Ce type de phase est en effet couramment employé pour doser les acides gras, les acides cyclopropéniques (GAYDOU et RAMA-NOELINA, 1984) et les acides aminés (JOHNSON *et al.*, 1961).

Cet article a pour objet de faire le point sur les différentes méthodes de dosage des alditol-acétates et de présenter une nouvelle technique rapide pour l'analyse des polysaccharides par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire imprégnée de Carbowax 20 M.

#### MÉTHODES TRADITIONNELLES DE DOSAGE DES ALDITOL-ACÉTATES

L'étude des constituants des polysaccharides des parois cellulaires végétales a particulièrement progressé ces dernières années grâce à la chromatographie en phase gazeuse. Cependant, cette technique nécessite la transformation des substances en dérivés volatils tels que triméthyl silyls (TMS) (SWBELEY *et coll.*, 1963), méthyl glucosides (BISHOP, 1964), acétates (BEBAULT *et coll.*, 1972), alditol-acétates, (BJORNDALE *et coll.*, 1967), aldonitrile acétates (DMITRIEV *et coll.*, 1971), et TMS alditols (BRADBURY *et*

coll., 1981). Les dérivés alditol-acétates présentent l'avantage de ne donner qu'un seul pic par aldose. Il faut noter néanmoins que cette méthode ne convient pas pour doser les cétooses et les oligosaccharides qui donnent plusieurs pics par sucre.

Le tableau 1 résume les différentes méthodes de dosage des alditol-acétates, les caractéristiques des colonnes utilisées, les durées et températures d'acétylation, les durées d'analyse pour différents aldoses ou dérivés dosés.

#### MATÉRIEL ET NOUVELLE TECHNIQUE

##### Matériel végétal

Pour cette étude, nous nous sommes intéressés à l'analyse des polysaccharides des parois cellulaires des

fibres du cotonnier, *Gossypium barbadense* L., variété Giza 75 d'origine égyptienne. Nous avons isolé les principaux composants suivant le protocole opératoire décrit par MEINERT et DELMER (1977), BOURELY (1978) et HUWYLER

TABLEAU 1. — Méthodes de dosage des alditol-acétates.

Auteurs	Année	Colonne	Longueur (L) et diamètre (D) de la colonne (L m × D mm)	Phase stationnaire	Durée et température de l'acétylation	Durée de l'analyse	Oses et dérivés dosés *
SAWARDEKER et coll.	1965	remplie	2 m × 4 mm	ECNSS-M à 3 %	2 h à 100 °C	70 mn	Rh - Fu - Ar - Xy - Ma - Ga - Glu
ALBERSHEIM et coll.	1967	remplie	1,2 m × 3 mm	Mélange de 0,2 % PEGS-0,2 % PEGA et 0,4 % silicone XF-1150	3 h à 121 °C	75 mn	Rh - Fu - Ar - Xy - Ma - Ga - Glu - Inos
CROWELL et BURNETT	1967	remplie	1,8 m × 6 mm	ECNSS-M à 3 %	14 h à 16 h à la température ambiante	75 mn	Rh - Ar - Xy - Ma - Ga - Glu
OADES	1967	remplie	1,84 m × 3 mm	ECNSS-M à 10 %	une nuit à la température ambiante	60 mn	Gl - Er - Th - Ri - Rh - Fu - Ar - Xy - Ma - Ga - Glu - Inos
JONES et ALBERSHEIM	1972	remplie	1,2 m × 3 mm	Mélange de : 0,2 % PEGS 0,2 % PEGA et 0,4 % silicone XF-1150	3 h à 121 °C	75 mn	Ru - Fu - Ar - Ap - Xy - Ma - Ga - Glu - A.MA - A.GA - A.Glu
DARVILL et coll.	1975	remplie	1,5 m × 4 mm	Mélange de : 0,3 % OV-275 et 0,4 % XF-1150	3 h à 121 °C	90 mn	Rh - Fu - Ar - Xy - Ma - Ga - Glu
BOURELY	1978	remplie	2 m × 4 mm	ECNSS-M à 3 %	2 h à 100 °C	70 mn	Rh - Fu - Ar - Xy - Ma - Ga - Glu
MALBY et coll.	1979	remplie	1,8 m × 2 mm	SP-2340 à 3 %	1 h 30 à 121 °C	60 mn	Ar - Xy - Ga - Glu - Inos
KLOK et coll.	1981	capillaire	25 m × 0,25 mm	OV-275	2 h à 100 °C	30 mn	Er - Rh - Fu - Ri - Ar - Xy - Ma - Ga - Glu - Inos
OSHIMA et coll.	1981	capillaire	a) 50 m × 0,2 mm b) 25 m × 0,25 mm	SP-2100 (non polarisé)	2 h à 100 °C	60 mn	Rh - Fu - Ar - Xy - Ma - Id - Ri - Al
SHIBUYA	1981	capillaire	30 m × 0,25 mm	Silar 10C	2 h à 100 °C	50 mn	Rh - Fu - Ar - Xy - Ga - Glu - Ma
BLAKENEY et coll.	1983	capillaire	28,5 m × 0,5 mm	Silar 10C	10 mn à la température ambiante	20 mn	Gl - Er - Rh - Fu - Ar - Xy - Ma - Ap - Al - Ga - Glu - Inos

\* Gl = glycérol, Er = érythritol, Th = thriose, Ri = ribose, Rh = rhamnose, Fu = fucose, Ar = arabinose, Ap = apiose, Xy = xylose, Al = aldose, Id = idiose, Ma = mannose, Ga = galactose, Glu = glucose, Inos = inositol, A.MA = acide mannuronique, A.GA = acide galacturonique, A.Glu = acide glucuronique.

et coll. (1979). La figure 1 présente le cheminement de la matière, les traitements auxquels elle est soumise et les différentes phases obtenues jusqu'à la fraction cellulosique purifiée (alpha-cellulose).

#### Analyse microchimique de chaque fraction

Les différentes fractions (matières pectiques, hémicellulose I, hémicellulose II, alpha cellulose) sont hydrolysées séparément par l'acide trifluoroacétique (TFA), transformées en alditol-acétates puis analysées par chromatographie en phase gazeuse afin de déterminer leur composition en aldoses.

Pour la préparation des alditol-acétates, nous avons utilisé le protocole opératoire (fig. 3) décrit par SAWARDEKER et coll. (1965) ; ALBERSHEIM et coll. (1967) ; CROWELL et BURNETT (1967) ; BOURELY (1978) et BLAKENEY et coll. (1983).

#### Hydrolyse acide

20 à 30 mg de chaque fraction sont hydrolysés par 2 ml d'acide trifluoroacétique 2N (TFA), dans des tubes de verre scellés, à l'étuve à 120 °C pendant 3 heures. L'échan-

tillon est ensuite centrifugé et le surnageant est recueilli dans un ballon à col rodé. Le résidu solide est rincé plusieurs fois avec de l'eau distillée. Les eaux de lavage et la fraction acide sont évaporées à sec, sous vide. L'extrait sec est repris plusieurs fois avec de l'eau distillée afin d'éliminer, sous l'action du vide, l'acide trifluoroacétique.

#### Réduction des aldoses

L'extrait sec et l'étalon interne sont traités par 1 ml de solution ammoniacale normale en présence de 20 mg de borohydrure de sodium (NaBH<sub>4</sub>) pendant une heure à la température ambiante. L'excès de borohydrure de sodium est ensuite neutralisé par quelques gouttes d'acide acétique glacial jusqu'à la fin de l'effervescence. Le liquide est alors partiellement desséché sous vide, dilué avec 1 ml de méthanol afin de méthyler les aldittols et desséché à nouveau. Cette opération est répétée 4 à 5 fois.

Afin d'éliminer, sous forme d'ester volatil, l'acide borique qui se forme lors de la décomposition du borohydrure de sodium (SCHLEISINGER et coll., 1953), 1 ml de solution d'acide acétique à 10 % dans le méthanol est ajouté à l'échantillon. Le liquide est partiellement desséché et repris par 1 ml de la même solution. Le tout est alors desséché complètement sous vide.

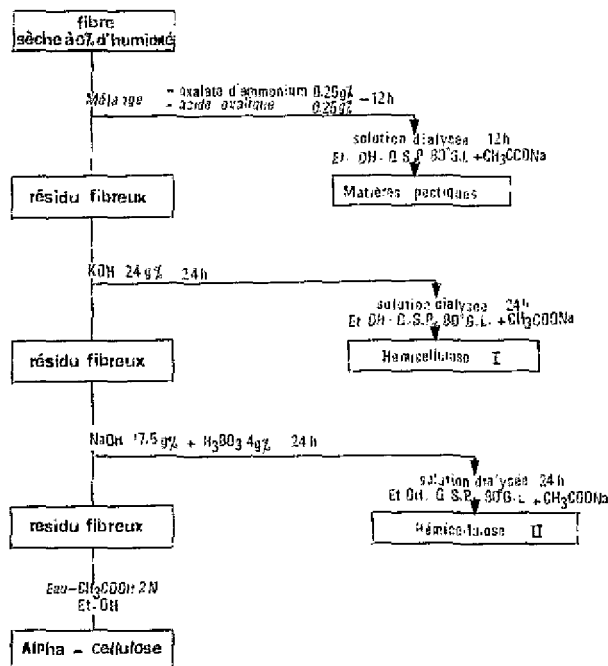


FIG. 1. — Protocole opératoire d'isolement des principaux constituants des fibres du cotonnier.

FIG. 1. — Operating method for isolating the main cotton fiber constituents.

### Acétylation

Les alditols sont acétylés par 2 ml d'anhydride acétique en présence de 0,2 ml de 1-méthylimidazole (catalyseur) durant 10 mn à la température ambiante. L'excès d'anhydride acétique est ensuite décomposé par 5 ml d'eau distillée. Après refroidissement, on ajoute 1 ml de dichlorométhane et le mélange des deux phases est agité afin de faciliter le passage des alditol-acétates dans la fraction organique. Celle-ci est prélevée après centrifugation et analysée par chromatographie en phase gazeuse.

Matériau première (Matières pectiques, Hemicellulose I, Hemicellulose II, etc. ...)

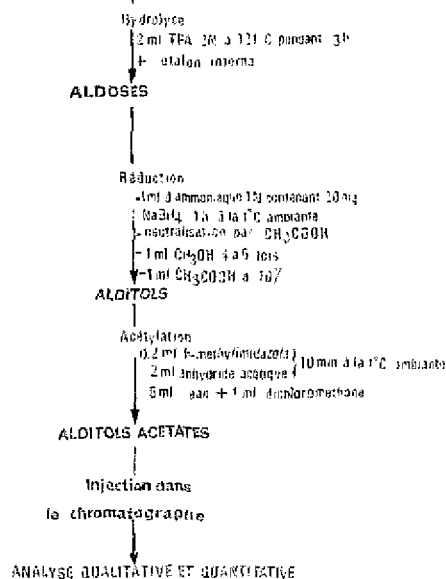


FIG. 2. — Schéma de l'analyse microchimique.

FIG. 2. — Diagram of the microchemical analysis.

### Chromatographie en phase gazeuse

a) Colonne capillaire (10 m × 0,25 mm) imprégnée à 0,14 % de Carbowax 20 M

1 µl de solution est injecté en mode « split ». Le chromatographe utilisé est un FRACTOVAP 4130 CARLO-ERBA équipé d'un injecteur Split-Splitless, d'un détecteur à ionisation.

### CHROMATOGRAMME TEMOIN D'ALDOSES

(dérivés alditol acétates)

1. Meso-Erythritol
2. L-Rhamnose
3. D-Fucose
4. L-Arabinose
5. D-Xylose
6. D-Mannose
7. D-Galactose
8. D-Glucose

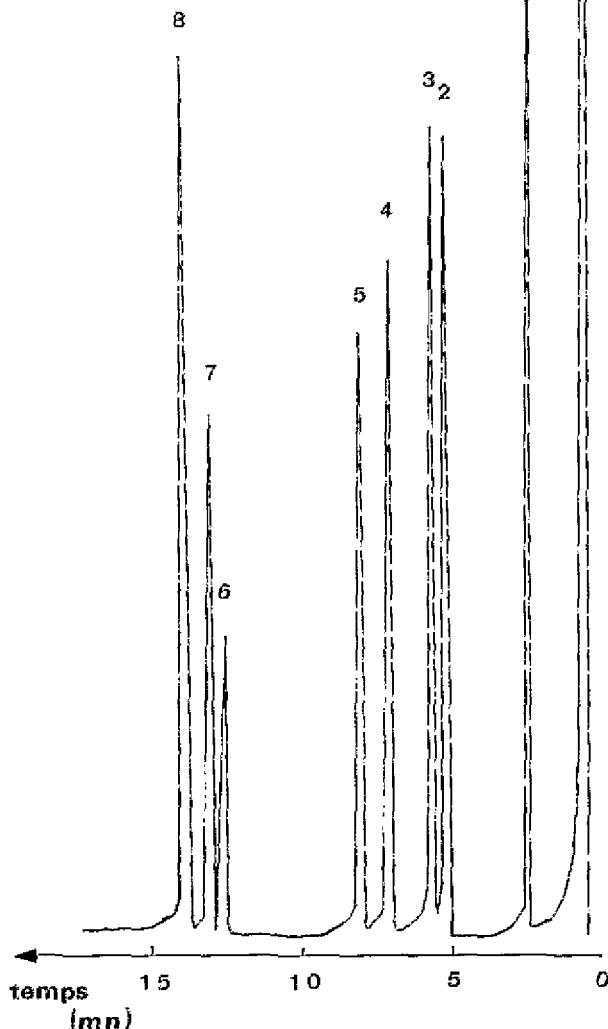


FIG. 3. — Chromatographie en phase gazeuse de dérivés alditol-acétates d'un mélange de 8 aldoses sur colonne capillaire (10 m, 0,14 % Carbowax 20 M) ; température du four : isotherme 180 °C pendant 4 mn puis programmée à raison de 3 °C/mn jusqu'à 220 °C ; température de l'injecteur et du détecteur : 275 °C ; débit de gaz vecteur (hélium) : 2 ml/mn en sortie de colonne.

FIG. 3. — Gas-liquid chromatography of alditol-acetate derivatives of a mixture of 8 aldoses on a capillary column (10 m, 0,14 % Carbowax 20 M) ; oven temperature : 180 °C during 4 mn, programmed up to 220 °C at the rate of 3 °C/mn. Temperature of the injector and detector : 275 °C ; output of the vector gas (helium) coming out of the column : 2 ml/mn.

### Chromatogramme d'un mélange de sucres (dérivés alditol-acétates)

- 1- L-Rhamnose
- 2- D-Fucose
- 3- L-Arabinose
- 4- D-Xylose
- 5- D-Mannose
- 6- D-Galactose
- 7- D-Glucose
- 8- Meso-Inositol

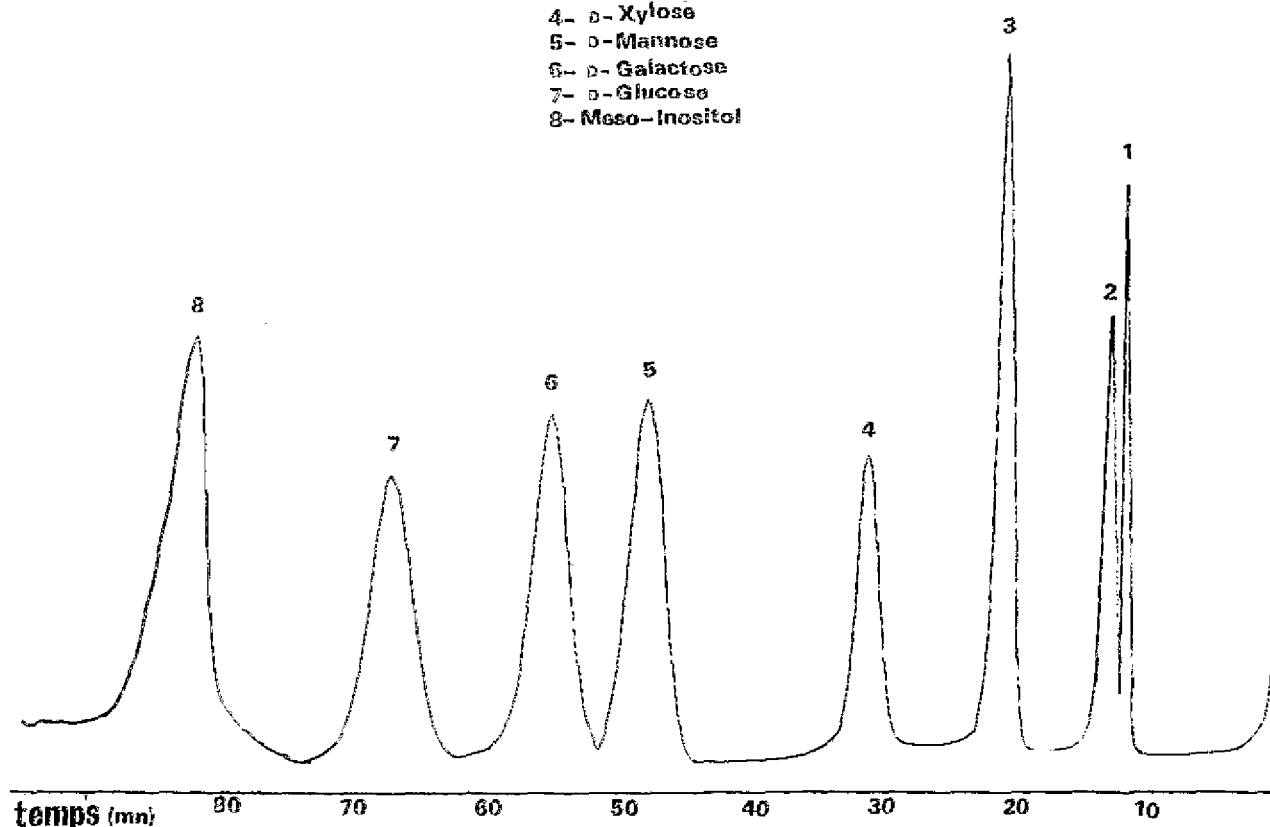


FIG. 4. — Chromatographie en phase gazeuse de dérivés alditol-acétates d'un mélange de 8 aldoses sur colonne remplie (2 m × 4 mm ; 3 % d'ECNSS-M sur chromosorb Q) ; température du four : isotherme 200 °C ; température de l'injecteur et du détecteur : 275 °C ; débit du gaz vecteur (azote) : 40 ml/min en sortie de colonne.

FIG. 4. — Gas-liquid chromatography of alditol-acetate derivatives of a mixture of 8 aldoses on a wall-coated column (2 m × 4 mm ; 3 % ECNSS-M on chromosorb Q) ; oven temperature : 200 °C ; temperature of the injector and detector : 275 °C ; output of the vector gas (nitrogen) coming out of the column : 40 ml/min.

sation de flamme FID 20, d'un programmeur électronique et d'un intégrateur à impression de rapport HEWLETT-PACKARD 3390. La température du four est maintenue à 180 °C durant 4 mn puis programmée jusqu'à 220 °C à raison de 3 °C/mn. La température de l'injecteur et du détecteur est de 275 °C. Le débit de gaz vecteur (hélium) est de 2 ml/min en sortie de colonne.

#### b) Colonne remplie (2 m × 4 mm) d'ECNSS-M à 3 % sur chromosorb Q

1 µl de solution est injecté dans une colonne en acier inoxydable. Le chromatographe utilisé est un CARLO-ERBA modèle GI-452 équipé d'un injecteur classique à septum, d'un détecteur à ionisation de flamme FID-20, et d'un enre-

gistreur SEFRAM-FE 7571. La température du four est maintenue à 200 °C pendant toute la durée de l'analyse. La température de l'injecteur et du détecteur est de 275 °C. Le débit de gaz vecteur (azote) est de 40 ml/min en sortie de colonne.

#### c) Colonne remplie (2,2 m × 3 mm) de SP-2340 à 5 % sur chromosorb Q

Les conditions opératoires utilisées sont identiques à celles du dispositif expérimental précédent (b). Les figures 3, 4, 5 présentent les trois chromatogrammes d'un mélange témoin d'alditol-acétates obtenus respectivement avec les trois colonnes : Carbowax 20 M, ECNSS-M, SP 2340.

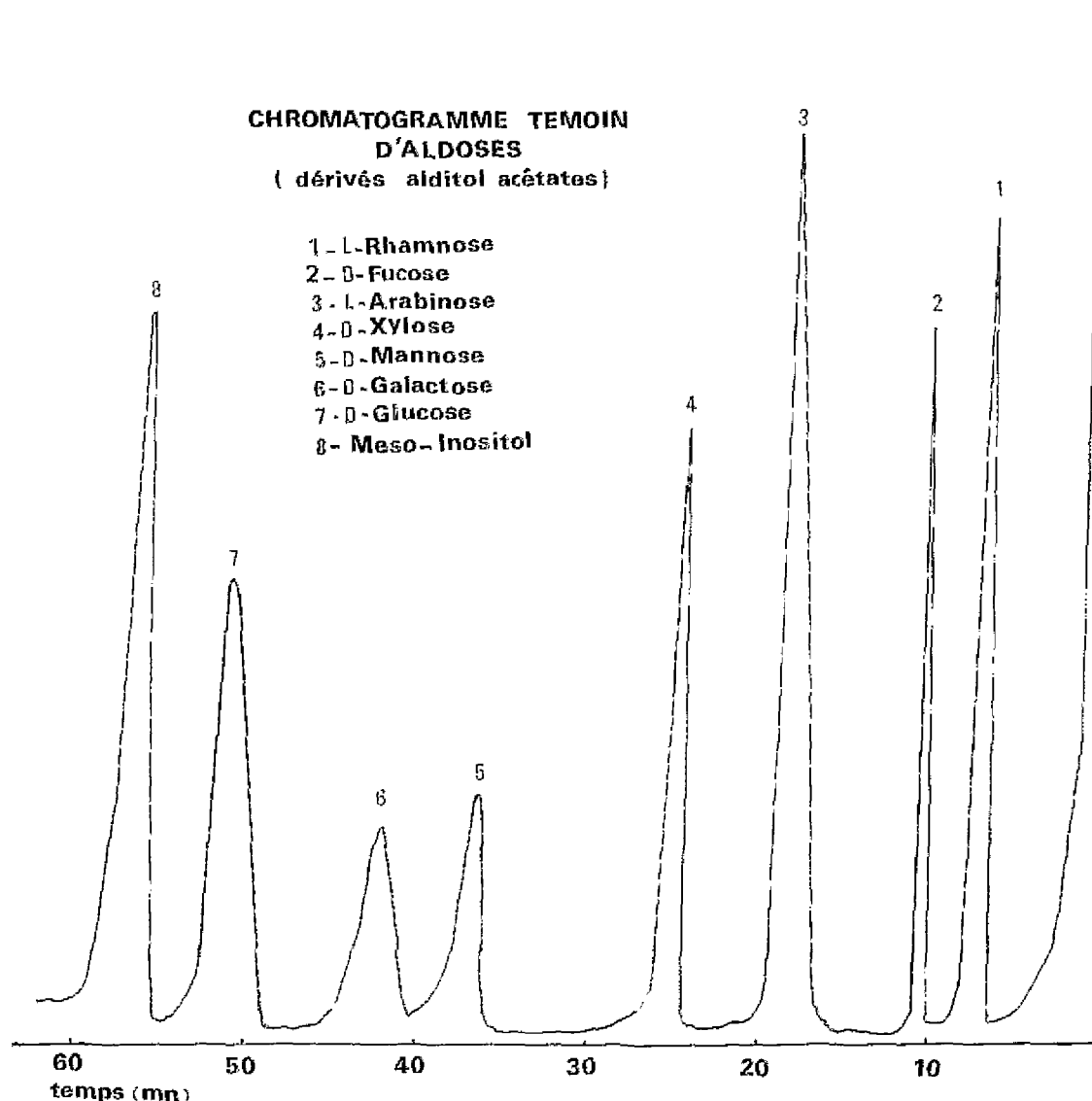


FIG. 5. — Chromatographie en phase gazeuse sur colonne remplie de dérivés alditol-acétates d'un mélange de 8 aldoses (2,2 m × 3 mm ; 5 % de SP-2340 sur chromosorb Q) ; température du four : isotherme 200 °C ; débit de l'injecteur et du détecteur : 275 °C ; débit du gaz vecteur (azote) : 40 ml/min en sortie de colonne.

FIG. 5. — Gas liquid chromatography of alditol-acetate derivatives of a mixture of 8 aldoses on a wall-coated column (2.2, m × 3 mm ; 5 % SP-2340 on chromosorb Q) ; oven temperature : 200 °C ; temperature of the injector and detector : 275 °C ; output of the vector gas (nitrogen) coming out of the column : 40 ml/min.

## RÉSULTATS

### Facteur de correction

Le facteur de correction ( $K_a$ ) des aldoses (dérivés alditol-acétates) est le rapport de l'aire du pic (A.E.) donnée par une masse d'étalon (M.E.) interne et de l'aire du pic (A.A.) correspondant à la même masse d'aldose (M.A.). Il est exprimé par la formule :

$$K_a = \frac{A.E. \times M.A.}{A.A. \times M.E.}$$

La teneur en aldose, exprimée en pourcentage par rapport à la fraction considérée, matière pectique par exemple, est donnée par la formule suivante :

$$\% \text{ aldose} = \frac{A.A. \times M.E. \times K_a \times 100}{A.E. \times \text{masse de matière pectique}}$$

Le tableau 2 indique les temps de rétention et les facteurs de correction ( $K_a$ ) des dérivés alditol acétates de quelques aldoses analysés avec les trois colonnes Carbowax 20 M, ECNSS-M et SP 2340.

### Droite de réponse

Nous avons chromatographié sur colonne capillaire Carbowax 20 M (fig. 6) un mélange contenant une égale quantité (2 mg) de 6 aldoses (Rh, Fu, Xy, Ar, Ga, Glu) et de 5 mg d'érythritol (étalon interne). La même analyse a été effectuée sur quatre autres mélanges constitués respectivement de 4, 6, 8 et 10 mg de chacun des aldoses précédents avec toujours 5 mg d'étalon interne. Pour chaque concentration d'aldose, la réponse du détecteur est évaluée par le rapport : surface d'aldose sur surface d'érythritol. Le tableau 3 et la figure 6 montrent que la relation entre la réponse du détecteur et la concentration (droite de réponse) est linéaire.

### Composition des polysaccharides des parois cellulaires des fibres du cotonnier

#### Principaux constituants :

- Matières pectiques : 0,90 %
- Hémicellulose I : 0,80 %
- Hémicellulose II : 1,20 %
- Alpha-cellulose : 96,20 %.



TABLEAU 2. — Temps de rétention et facteur de correction ( $K_a$ ) des dérivés alditol-acétates de quelques aldoses analysés par chromatographie en phase gazeuse avec les trois phases suivantes :

- a) Carbowax 20 M 0,14 % ;
- b) ECNSS-M 3 % sur Chromosorb Q ;
- c) SP 2340 5 % sur Chromosorb Q.

Aldoses	a)* Carbowax 20 M		b)** 3 % ECNSS-M		c)*** 5 % SP 2340	
	Temps de rétention (mn)	$K_a$	Temps de rétention (mn)	$K_a$	Temps de rétention (mn)	$K_a$
Erythritol	2,84	1,00	—	—	—	—
Rhamnose	5,87	0,68	12,28	0,42	8,84	0,48
Fucose	6,35	0,70	13,25	0,44	10,25	0,62
Arabinose	7,78	0,73	22,70	0,59	19,37	0,73
Xylose	8,83	0,76	33,44	0,65	24,93	0,84
Mannose	13,47	0,89	50,29	0,73	38,71	0,75
Galactose	13,91	0,86	57,34	0,95	43,36	0,91
Glucose	14,73	0,90	68,87	1,11	53,73	1,12
Meso-inositol	—	—	93,96	1,00	59,92	1,00

\* : Colonne capillaire 10 m  $\times$  0,25 mm ; température du four maintenue durant 4 mn à 180 °C puis programmée jusqu'à 220 °C à raison de 3 °C/mn ; température de l'injecteur et du détecteur : 275 °C.

\*\* : Colonne en acier inoxydable 2 m  $\times$  4 mm ; température du four isotherme : 200 °C ; température de l'injecteur et du détecteur : 275 °C.

\*\*\* : Colonne en acier inoxydable 2,2 m  $\times$  3 mm ; température du four isotherme : 200 °C ; température de l'injecteur et du détecteur : 275 °C.

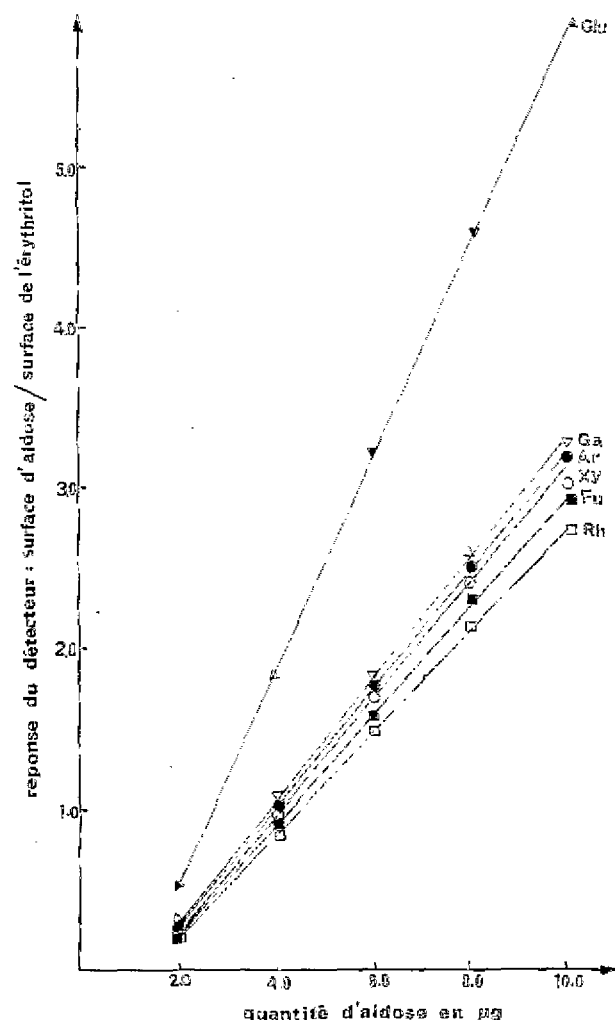


FIG. 6. — Droites de réponse des dérivés alditol-acétates des aldoses suivants : □ Rhamnose ; ■ Fucose ; ○ Xylose ; ● Arabinose ; ▽ Galactose ; ▲ Glucose par rapport à l'érythritol pris comme étalon interne (5 mg).

FIG. 6. — Response lines of the alditol-acetate derivatives of the following aldoses : □ Rhamnose ; ■ Fucose ; ○ Xylose ; ● Arabinose ; ▽ Galactose ; ▲ Glucose in relation to erythritol taken as internal standard (5 mg).

TABLEAU 3. — Réponse du détecteur (F.I.D.) estimée par les rapports des surfaces des pics chromatographiques enregistrés pour des concentrations croissantes d'aldoses et pour une quantité d'étalon interne constante de 5 mg d'érythritol.

Aldoses (dérivés alditol-acétates)	Quantité d'aldose (en mg)				
	2	4	6	8	10
Rhamnose	0,24*	0,85	1,48	2,10	2,73
Fucose	0,21	0,92	1,57	2,28	2,92
Arabinose	0,18	1,11	1,78	2,52	3,18
Xylose	0,30	0,96	1,68	2,40	2,93
Galactose	0,26	0,98	1,82	2,59	3,23
Glucose	0,53	1,92	3,20	4,63	5,92

\* Surface d'aldose par rapport à la surface de l'étalon interne (moyenne de deux analyses).

#### Composition en aldoses de chaque fraction

Chaque fraction est analysée suivant les conditions opératoires décrites précédemment (p. 2) avec les trois colonnes Carbowax 20 M, ECNSS-M et SP 2340. La composition en aldoses des polysaccharides des fibres du cotonnier est exprimée en pourcentages relatifs (tabl. 4).

La principale observation que l'on peut formuler à l'examen du tableau 4 est la suivante : quelle que soit la phase utilisée, Carbowax 20 M, ECNSS-M ou SP 2340, on note toujours la présence de tous les aldoses, en quantité sensiblement égale, dans chacune des 4 fractions analysées.

Il faut noter, d'autre part, que la durée de l'analyse avec la phase Carbowax 20 M est seulement de 15 mn, par conséquent très réduite par rapport aux colonnes remplies ECNSS-M (90 mn) et SP 2340 (60 mn) (tabl. 2).

TABLEAU 4. — Composition en aldoses des polysaccharides des fibres du cotonnier \*.

Polysaccharides	Aldoses	Type de colonne utilisée		
		capillaire	remplie	
		Carbowax 20 M	ECNSS-M	SP 2340
Matières pectiques	Rhamnose	7,00	6,85	6,00
	Fucose	traces	traces	traces
	Arabinose	23,00	22,90	23,40
	Xylose	0,80	1,00	1,10
	Mannose	2,10	1,80	2,00
	Galactose	10,00	9,85	10,20
	Glucose	57,10	57,60	57,30
Hemicellulose I	Rhamnose	2,05	1,85	2,10
	Fucose	traces	traces	traces
	Arabinose	10,10	9,90	10,00
	Xylose	25,00	23,20	25,40
	Mannose	1,10	0,95	1,00
	Galactose	8,65	8,80	9,00
	Glucose	53,10	55,30	52,50
Hemicellulose II	Rhamnose	5,60	5,10	6,70
	Fucose	traces	traces	traces
	Arabinose	12,30	10,90	11,50
	Xylose	5,25	5,00	4,50
	Mannose	traces	traces	traces
	Galactose	20,45	22,75	21,45
	Glucose	56,40	55,25	55,85
Alpha cellulose	Rhamnose	traces	traces	traces
	Fucose	—	—	—
	Arabinose	4,45	4,90	4,37
	Xylose	0,80	0,75	0,92
	Mannose	traces	traces	traces
	Galactose	—	—	—
	Glucose	94,75	94,35	94,71

\* Ces résultats sont exprimés en pourcentages relatifs.

## CONCLUSIONS

Plusieurs méthodes sont particulièrement adaptées pour doser les aldoses sous forme de dérivés alditol-acétates par chromatographie en phase gazeuse. La méthode classique de SAWARDEKER et coll. (1965) réalise l'acétylation par l'anhydride acétique en présence de pyridine en 2 à 3 heures à 100 °C.

Une alternative intéressante est offerte par l'utilisation du 1-méthylimidazole qui permet de réduire la durée de l'acétylation à 10 mn et de réaliser cette opération à température ambiante. Cette nouvelle méthode, que nous venons de décrire, offre, par rapport aux précédentes, l'avantage d'être plus rapide, plus efficace et plus sélective.

Une amélioration très sensible de la méthode est également apportée par l'utilisation d'une colonne capillaire, imprégnée de Carbowax 20 M, en remplacement des colonnes remplies traditionnelles.

En outre, la phase Carbowax 20 M est intéressante à un

autre titre, car elle est utilisée couramment pour l'analyse de nombreux autres produits, dans la plupart des laboratoires de recherches biochimiques.

De plus, dans le cadre de nos recherches sur les polysaccharides des parois cellulaires des fibres du cotonnier, elle fournit des résultats tout à fait comparables à ceux que l'on obtient en utilisant des colonnes remplies d'ECNSS-M et de SP 2340 sur chromosorb Q.

Toutes ces améliorations, apportées aux méthodes traditionnelles, sont liées d'une part à l'emploi du 1-méthylimidazole comme catalyseur d'acétylation, mais elles proviennent incontestablement aussi des progrès sensibles réalisés dans le domaine de la chromatographie en phase gazeuse, à la fois dans la fabrication des colonnes capillaires et à leur mise en œuvre, mais également aux caractéristiques technologiques accrues des appareils, qui deviennent de plus en plus performants.

## BIBLIOGRAPHIE

1. ALBERSHEIM (P.), NEVINS (D. J.), ENGLISH (P. D.), KARR (A.), 1967. — A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.*, 5, 340-345.
2. BEBAULT (G. M.), DUTTON (G. G. S.), WALKER (R. H.), 1972. — Separation by gas-liquid chromatography of tetra-O-methylaldohexoses and other sugars as acetates. *Carbohydr. Res.*, 23, 430-432.
3. BJØRNDAL (H.), LINDBERG (B.), SVENSONS (S.), 1967. — *Acta Chem. Scand.*, 21, 1801.
4. BISHOP (C. T.), 1964. — Gas-liquid chromatography of carbohydrate derivatives. *Advan. Carbohydr. Chem.*, 19, 95.
5. BLAKENEY (A. B.), HARRIS (P. J.), HENRY (R. J.), STONE (B. A.), 1983. — A simple and rapid preparation of alditol for monosaccharide analysis. *Carbohydr. Res.*, 113, 291-299.

6. BOURELY (J.), 1978. — Ontogénie des fibres textiles de l'*Hibiscus cannabinus* L. (Malvacées). Thèse de doctorat d'Etat, Univ. Pierre et Marie Curie, Paris VI.
7. BRADBURY (A. G. W.), HALLIDAY (D. J.), MEDCALF (D. G.), 1981. — Separation of monosaccharides as trimethylsilylated alditols on fused-silica capillary columns. *J. Chromatography*, 213, 146-150.
8. CROWELL (E. P.), BURNETT (R. E.), 1967. — Determination of the carbohydrate composition of wood pulps by gas liquid chromatography of the alditol acetates. *Anal. Chem.*, 39, 121-124.
9. DARVILL (A. G.), ROBERTS (D. P.), HALL (M. A.), 1975. — Improved gas-liquid chromatographic separation of methylated alditols. *J. Chromatography*, 115, 319-324.
10. DMITRIEV (B. A.), BACKINOWSKY (L. V.), CHIZHOV (O. S.), ZOLOTAREV (B. M.), KOCHETKOV (N. K.), 1971. — Gas-liquid chromatography and mass spectrometry of aldonitrile acetates and partially methylated aldonitrile acetates. *Carbohydr. Res.*, 19, 432-435.
11. GAYDOU (E. M.), RAMANOELINA (A. R. P.), 1984. — Cyclopropenoic fatty acids of Malvaceae seed oils by gas-liquid chromatography. *Fette. Seifen. Anstrichmittel*, 86, 82-84.
12. HUWYLER (H. R.), FRANZ (G.), MEIER (H.), 1979. — Changes in the composition of cotton fibre cell walls during development. *Planta*, 146, 635-642.
13. JOHNSON (D. E.), SCOTT (S. J.), MEISTER (A.), 1961. — Gas-liquid chromatography of amino acid derivatives. *Anal. Chem.*, 33, 669-673.
14. JONES (T. M.), ALBERSHEIM (P.), 1972. — A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiol.*, 49, 926-936.
15. KLOK (J.), NIEBERG-VAN VELZEN (E. H.), DE LEEUW (J. W.), SCHENCK (P. A.), 1981. — Capillary gas chromatographic separation of monosaccharides as their alditol acetates. *J. Chromatography*, 207, 273-275.
16. MALTBY (D.), CARPITA (N. C.), MONTEZINOS (D.), KULOW (C.), DELMER (D. P.), 1979. — B-1, 3-Glucan in developing cotton fibers. *Plant Physiol.*, 63, 1158-1164.
17. MEINERT (M. C.), DELMER (D. P.), 1977. — Changes in biochemical composition of the cell wall of the cotton fiber during development. *Plant Physiol.*, 59, 1088-1097.
18. OADES (J. M.), 1967. — Gas-liquid chromatography of alditol acetates and its application to the analysis of sugars in complex hydrolysates. *J. Chromatography*, 28, 246-252.
19. OSHIMA (R.), YOSHIKAWA (A.), KUMANOTANI JU, 1981. — High-resolution gas chromatographic separation of alditol acetates on fused-silica wall-coated open-tubular columns. *J. Chromatography*, 115, 319-324.
20. SAWARDEKER (J. S.), SLONEKER (J. H.), JEANES (A.), 1965. — Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography. *Anal. Chem.*, 37, 1602-1604.
21. SCHLEISINGER (H. E.), BROWN (H. C.), MAYFELD (D. K.), GILBREATH (J. R.), 1953. — Procedures for the preparation of methyl borate. *J. Amer. Chem. Soc.*, 75, 213-215.
22. SHIBUYA (N.), 1981. — Gas-liquid chromatographic analysis of partially methylated alditol acetates on a glass capillary column. *J. Chromatography*, 208, 96-99.
23. SWEELEY (C. C.), BENTLY (R.), MAKITA (M.), WELLS (W. W.), 1963. — Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J. Amer. Chem. Soc.*, 85, 2497-2507.

## Rapid determination of alditol-acetates by gas-liquid chromatography.

### Application to the analysis of cotton fiber cell wall polysaccharides.

M. G. Taha \*, C. Marquie and J. Bourelly \*\*

\* Faculty of Agronomy, Alazher University, Cairo (Egypt).

\*\* Laboratory of Textile Plant Chemistry, I.R.C.T.-C.I.R.A.D., B.P. 5035, Montpellier Cedex, France.

## SUMMARY

A new and rapid method of preparing and determining alditol-acetates by gas liquid chromatography on a capillary column is described. It is particularly well-adapted to aldose analysis: after acid hydrolysis of cotton fiber cell wall polysaccharides (*Gossypium barbadense* L.), Aldoses (monosaccharides) are reduced by sodium borohydride in an ammoniacal solution. Alditols are formed this way and acetylated by 1-methylimidazol

and acetic anhydride during 10 mn at ambient temperature. Alditol-acetates are then separated and determined by gas-liquid chromatography on a Carbowax 20 M impregnated capillary column. The results obtained are entirely comparable to those given by conventional method (wall-coated column by ECHSS-M and SP-2340 on chromosorb Q). This new method is much more rapid, effective and selective.

KEY WORDS : walls, polysaccharides, cotton, alditol-acetates.



## INTRODUCTION

For the determination of many substances, gas-liquid chromatography increasingly uses capillary columns instead of wall-coated columns. As compared with conventional columns, the numerous advantages are the following : higher efficiency and selectivity, lower solution retaining time, very small volume of sample injected. Moreover, for research laboratories often performing very diverse analyses, the possibility of using the same type of column to determine substances of very different kinds is extremely interesting. That is the reason why we were led to

determine alditol-acetates on a Carbowax 20 M impregnated capillary column. This type of column is commonly used to determine fatty acids, cyclopropenoic acids (GAYDOU and RAMANOELINA, 1984), and amino acids (JOHNSON *et al.*, 1961).

This paper aims at surveying the different methods of determining alditol-acetates and presenting a rapid method of analysing polysaccharides by gas-liquid chromatography on a Carbowax 20 M impregnated capillary column.

## CONVENTIONAL PROCEDURES FOR THE DETERMINATION OF ALDITOL-ACETATES

The study of the constituents of plant cell-wall polysaccharides has particularly progressed these last few years thanks to gas-liquid chromatography. However, this technique requires substances be transformed into volatile derivatives such as trimethylsilyls (TMS) (SWEETLEY *et al.*, 1963), methyl glucosids (BISHOP, 1964), acetates (BEBAULT *et al.*, 1972), alditol acetates (BJORNOAL *et al.*, 1967), aldonitrile acetates (DMITRIEV *et al.*, 1971) and TMS alditols (BRADBURY *et al.*, 1981). Alditol acetate derivatives

have the advantage of giving one peak per aldose. It should however be noted that this method cannot be used to determine cetoses and oligosaccharides which give several peaks per sugar.

Table 1 shows the different methods for the determination of alditol acetates, the characteristics of the columns used, the acetylation durations and temperatures and the analysis durations for different aldoses or derivatives determined.

TABLE 1. — Methods for the determination of alditol-acetates.

Authors	Year	Column	Length (L) and diameter (D) of the column (L m × D mm)	Stationary phase	Duration and temperature of acetylation	Analysis duration	Ses and derivatives determined
SAWARDEKER <i>et al.</i>	1965	wall-coated	2 m × 4 mm	ECNSS-M at 3 %	2 h at 100 °C	70 mn	Rh - Fu - Ar - Xy - Ma - Ga - Glu
ALBERSHEIM <i>et al.</i>	1967	wall-coated	1.2 m × 3 mm	Mixture of : 0.2 % PEGS-0.2 % PEGA and 0.4 % silicone XF-1150	3 h at 121 °C	75 mn	Rh - Fu - Ar - Xy - Ma - Ga - Glu - Inos
CROWELL and BURNETT	1967	wall-coated	1.8 m × 6 mm	ECNSS-M at 3 %	14 h at 16 h at ambient temperature	75 mn	Rh - Ar - Xy - Ma - Ga - Glu
OADES	1967	wall-coated	1.84 m × 3 mm	ECNSS-M at 10 %	one night at ambient temperature	60 mn	Gl - Er - Th - Ri - Rh - Fu - Ar - Xy - Ma - Ga - Glu - Inos
JONES and ALBERSHEIM	1972	wall-coated	1.2 m × 3 mm	Mixture of : 0.2 % PEGS, 0.2 % PEGA and 0.4 % silicone XF-1150	3 h at 121 °C	75 mn	Ru - Fu - Ar - Ap - Xy - Ma - Ga - Glu - A.MA - A.GA - A.Glu
DARVILL <i>et al.</i>	1975	wall-coated	1.5 m × 4 mm	Mixture of : 0.3 % OV-275 and 0.4 %, XF-1150	3 h at 121 °C	90 mn	Rh - Fu - Ar - Xy - Ma - Ga - Glu
BOURELY	1978	wall-coated	2 m × 4 mm	ECNSS-M at 3 %	2 h at 100 °C	70 mn	Rh - Fu - Ar - Xy - Ma - Ga - Glu
MALTBY <i>et al.</i>	1979	wall-coated	1.8 m × 2 mm	SP-2340 at 3 %	1 h 30 at 121 °C	60 mn	Ar - Xy - Ga - Glu - Inos
KLOK <i>et al.</i>	1981	capillary	25 m × 0.25 mm	OV-275	2 h at 100 °C	30 mn	Er - Rh - Fu - Ri - Ar - Xy - Ma - Ga - Glu - Inos
OSHIMA <i>et al.</i>	1981	capillary	a) 50 m × 0.2 mm b) 25 m × 0.25 mm	SP-2100 (unpolar)	2 h at 100 °C	60 mn	Rh - Fu - Ar - Xy - Ma - Id - Ri - Al
SHIBUYA	1981	capillary	30 m × 0.28 mm	Silar 10C	2 h at 100 °C	50 mn	Rh - Fu - Ar - Xy - Ga - Glu - Ma
BLAKENEY <i>et al.</i>	1983	capillary	28.5 m × 0.5 mm	Silar 10C	10 mn at ambient temperature	20 mn	Gl - Er - Rh - Fu - Ar - Xy - Ma - Ap - Al - Ga - Glu - Inos

\* Gl = glycerol, Er = erythritol, Th = thriose, Ri = ribose, Rh = rhamnose, Fu = fucose, Ar = arabinose, Ap = apiose, Xy = xylose, Al = allose, Id = idiose, Ma = mannose, Ga = galactose, Glu = glucose, Inos = inositol, A.MA = mannuronic acid, A.GA = galacturonic acid, A.Glu = glucuronic acid.

## MATERIALS AND METHOD

## Materials

We have analysed cell-wall polysaccharides of fibres of *Gossypium barbadense* L., GIZA 75 variety, from Egypt. We have isolated the main components according to the procedure described by MENERT and DELMER (1977), BOURELY (1978) and HUWYLER *et al.* (1979).

Figure 1 shows the evolution of the matter, the treatments applied and the different phases obtained until purified cellulose fraction (alpha cellulose).

## Microchemical analysis of each fraction

The different fractions (pectic matters, hemicellulose I, hemicellulose II, alpha cellulose) were hydrolysed separately by trifluoroacetic acid (TFA), transformed into alditol acetates and analysed by gas-liquid chromatography to determine their aldose composition.

For the preparation of alditol acetates, we have used the procedure (fig. 2) described by SAWARDEKER *et al.* (1965), ALBERSHEIM *et al.* (1967), CROWL and BURNETT (1967), BOURELY (1978), and BLAKENEY *et al.* (1983).

## Acid hydrolysis

20 to 30 mg of each fraction were hydrolysed by 2 ml of trifluoroacetic acid (TFA) in sealed glass tubes, in an autoclave at 120 °C during 3 hours. Afterwards, the sample was centrifuged and the supernatant collected in a balloon with a stoppered neck. The solid residue was rinsed several times with distilled water. The washing waters and acid fraction were dry evaporated, under vacuum. The dry extract was diluted several times with distilled water to remove trifluoroacetic acid.

## Reduction of aldoses

The dry extract and internal standard were treated with 1 ml normal ammonia solution in the presence of 20 mg sodium borohydride (Na BH<sub>4</sub>) during one hour at ambient temperature. Excessive sodium borohydride was then neutralized by several drops of glacial acetic acid until effervescence ended. The liquid was then partially dried under vacuum, diluted with 1 ml methanol to methylate alditols and dried again. This was repeated 4 to 5 times.

In order to eliminate, as volatile ester, the boric acid which formed while sodium borohydride was decomposing

(SCHLEISINGER *et al.*, 1953), 1 ml acetic acid solution at 10 % in methanol was added to the sample. The liquid was partially dried and diluted by 1 ml of the same solution. The lot was then completely dried under vacuum.

## Acetylation

Alditols were acetylated by 2 ml acetic anhydride in presence of 0.2 ml 1-methylimidazole (catalyser) during 10 mn at ambient temperature. Excessive acetic anhydride was then decomposed by 5 ml distilled water. After cooling, 1 ml dichloromethane was added and the mixed two phases were agitated to make it easier for alditol acetates to join the organic fraction. The latter is collected after centrifugation and analysed by gas liquid chromatography.

## Gas liquid chromatography

## a) Carbowax 20 M capillary column (10 m × 0.25 mm)

1 µl solution was « split » injected. The chromatograph used was a FRACTOVAP 4130 CARLO-ERBA equipped with a Split-Splitless injector, a FID 20 flame ionization detector, an electronic programmer and a HEWLETT-PACKARD 3390 report integrator. Temperature in the oven was 180 °C during 4 mn then programmed up to 200 °C, at the rate of 3 °C/mn.

Injector and detector temperature was 275 °C. The output of the vector gas (helium) coming out of the column was 2 ml/mn.

## b) Wall-coated column (2 m × 4 mm) by ECNSS-M 3 % on chromosorb Q

1 µl solution was injected in a stainless steel column. The chromatograph used was CARLO-ERBA, GI-452 model, equipped with a standard septum injector, a FID-20 flame ionization detector and a SEFRAM-PE 7571 recorder. Temperature in the oven was 200 °C throughout the analysis. Injector and detector temperature was 275 °C. The output of the vector gas (nitrogen) coming out of the column was 40 ml/mn.

## c) Wall-coated column (2.2 m × 3 mm) by SP-2340 5 % on chromosorb Q

The procedures was the same as that used in the previous experiment (b). Figure 3, 4 and 5 show the three chromatograms of a check mixture of alditol-acetates obtained with Carbowax 20 M, ECNSS-M and SP 2340 columns respectively.

## RESULTS

## Correction factor

The correction factor (Ka) of aldoses (alditol-acetate derivatives) is the ratio of the peak area (PA) given by a mass of internal standard (M.S.) and the peak area (A.A.) corresponding to the same aldose mass (R.A.). Its formula is the following :

$$K_a = \frac{P.A. \times M.A.}{A.A. \times R.S.}$$

The aldose content, expressed in percentage in relation to the fraction involved, pectic matter for instance, is given by the following formula :

$$\text{aldose \%} = \frac{A.A. \times M.S. \times K_a \times 100}{A.E. \times \text{pectic matter mass}}$$

Table 2 shows the retention times and correction factors (Ka) of the alditol-acetate derivatives of several aldoses analysed with the three columns Carbowax 20 M, ECNSS-M and SP 2340.

## Response line

We have chromatographed on Carbowax 20 M (fig. 6) a mixture containing an equal quantity (2 mg) of 6 aldoses (Rh, Fu, Xy, Ar, Ga, Glu) and 5 mg erythritol (internal standard). The same analysis has been carried out on four other mixtures comprising respectively 4, 6, 8 and 10 mg of the above mentioned aldoses as well as 5 mg internal standard. For each aldose concentration, the detector response was estimated with the following ratio : aldose area by erythritol area.

TABLE 2. — Retention times and correction factors ( $K_a$ ) of the alditol-acetate derivatives of several aldoses analysed by gas-liquid chromatography with the following three columns :

- a) carbowax 20 M 0.14 % ;
- b) ECNSS-M 3 % on chromosorb Q ;
- c) SP 2340 5 % on chromosorb Q.

Aldoses	a)* Carbowax 20 M		b)** 3 % ECNSS-M		c)*** 5 % SP 2340	
	Retention time (mn)	$K_a$	Retention time (mn)	$K_a$	Retention time (mn)	$K_a$
Erythritol	2.84	1.00	—	—	—	—
Rhamnose	5.87	0.68	12.28	0.42	8.84	0.48
Fucose	6.35	0.70	13.25	0.44	10.25	0.62
Arabinose	7.78	0.73	22.70	0.59	19.37	0.73
Xylose	8.83	0.76	33.44	0.65	24.93	0.84
Mannose	13.47	0.89	50.29	0.73	38.71	0.75
Galactose	13.91	0.86	57.34	0.95	43.36	0.91
Glucose	14.79	0.90	68.87	1.11	53.73	1.12
Meso-inositol	—	—	83.96	1.00	59.92	1.00

\* : Capillary column 10 m  $\times$  0.25 mm ; oven temperature : 180 °C during 4 mn then programmed up to 220 °C at the rate of 3 °C/mn ; temperature of the injector and detector : 275 °C.

\*\* : Stainless steel column 2 m  $\times$  4 mm ; isothermal oven temperature : 200 °C ; temperature of the injector and detector : 275 °C.

\*\*\* : Stainless steel column 2.2 m  $\times$  3 mm ; isothermal oven temperature : 200 °C ; temperature of the injector and detector : 275 °C.

TABLE 3. — Detector response (F.I.D.) estimated by the ratios of the areas of the chromatographic peaks obtained with increasing aldose contents and a constant amount of internal standard of 5 mg erythritol.

Aldoses (alditol-acetate derivatives)	Aldose amount in mg				
	2	4	6	8	10
Rhamnose	0.24*	0.85	1.48	2.10	2.73
Fucose	0.21	0.92	1.57	2.28	2.92
Arabinose	0.18	1.11	1.78	2.52	3.18
Xylose	0.30	0.96	1.68	2.40	2.98
Galactose	0.26	0.98	1.82	2.59	3.28
Glucose	0.53	1.82	3.20	4.63	5.92

\* Aldose area in relation to internal standard area (mean of two analyses).

TABLE 4. — Aldose composition of cotton fiber polysaccharides.

Polysaccharides	Aldoses	Type of column used		
		Capillary	Wall-coated	
		Carbowax 20 M	ECNSS-M	SP 2340
Pectic matters	Rhamnose	7.00	6.85	6.00
	Fucose	traces	traces	traces
	Arabinose	23.00	22.90	23.40
	Xylose	0.80	1.00	1.10
	Mannose	2.10	1.80	2.00
	Galactose	10.00	9.85	10.20
	Glucose	57.10	57.60	57.30
Hemicellulose I	Rhamnose	2.05	1.85	2.10
	Fucose	traces	traces	traces
	Arabinose	10.10	9.90	10.00
	Xylose	25.00	23.20	25.40
	Mannose	1.10	0.95	1.00
	Galactose	8.65	8.80	9.00
	Glucose	53.10	55.30	52.50
Hemicellulose II	Rhamnose	5.60	6.10	6.70
	Fucose	traces	traces	traces
	Arabinose	12.30	10.90	11.50
	Xylose	5.25	5.00	4.50
	Mannose	traces	traces	traces
	Galactose	20.45	22.75	21.45
	Glucose	56.40	55.25	55.85
Alpha cellulose	Rhamnose	traces	traces	traces
	Fucose	—	—	—
	Arabinose	4.45	4.90	4.37
	Xylose	0.80	0.75	0.92
	Mannose	traces	traces	traces
	Galactose	—	—	—
	Glucose	94.75	94.35	94.71

\* These results are expressed in relative percentages.

Table 3 and figure 6 show that the relation between detector response and concentration (response line) is linear.

#### Composition of cotton fiber cell wall polysaccharides

##### Main constituents :

Pectic matters	: 0.90 %
Hemicellulose I	: 0.80 %
Hemicellulose II	: 1.20 %
Alpha-cellulose	: 96.20 %.

##### Aldose composition of each fraction :

Each fraction was analysed according to the procedure described before (page 3) with Carbowax 20 M, ECNSS-M and SP 2340.

The aldose composition of cotton fiber polysaccharides is expressed in relative percentages (table 4).

Having examined table 4, we can make the following observation : all the aldoses are present in approximately equal quantities in each of the four fractions, whatever the column used is, Carbowax 20 M, ECNSS-M or SP 2340. It should also be noted that the analysis only lasts 15 mn with Carbowax 20 M ; this is of course very rapid as compared to ECNSS-M (90 mn) and SP 2340 (60 mn) (table 2).

### CONCLUSIONS

Several methods are well-adapted to the determination of aldoses as alditol-acetate derivatives by gas-liquid chromatography. The standard method of SAWARDEKER *et al.* (1965) achieves acetylation by acetic anhydride in presence of pyridine in 2 to 3 hours at 100 °C.

An interesting alternative is offered by the use of 1-methylimidazol which reduces the duration of acetylation to 10 mn and achieves this operation at ambient temperature.

This method, that we have just described, has the advantage of being more rapid, efficient and selective than the previous ones.

The method is also considerably improved with the use

of an impregnated Carbowax 20 M capillary column, instead of conventional wall coated columns. Also, Carbowax 20 M offers another advantage : it is commonly used to analyse many other substances in most biochemical research laboratories. Furthermore, in the context of our research on cotton fiber cell-wall polysaccharides, the results it gives compare with those obtained with wall coated columns of ECNSS-M and SP 2340 on chromosorb Q.

All these improvements to conventional methods are due to the use of 1-methylimidazol as acetylation catalyser. But they also results from the great progress made in gas-liquid chromatography regarding the manufacturing of capillary columns, and their improved technological characteristics which make them increasingly reliable.

### RESUMEN

Un nuevo método rápido para preparar y determinar los alditol-acetatos por cromatografía en fase gaseosa sobre columna capilar está descrito. Está muy bien adaptado al análisis de los aldosa tras hidrólisis ácida de los polisacáridos de las paredes celulares de las fibras de algodón (*Gossypium barbadense* L.). Los aldosos (monosacáridos) están reducidos por el borohidruro de sodio en una solución amoniaca. Los alditoles así formados están acetilados por el 1-metilimidazol y anhídrido acético, durante

10 minutos a temperatura ambiente. Los alditol-acetatos están después separados y determinados por cromatografía en fase gaseosa sobre columna capilar impregnada de Carbowax 20 M. Los resultados obtenidos son muy comparables a los dados por los métodos convencionales que utilizan columnas llenas de ECNSS-M o SP 2340 sobre chromosorb Q. Este nuevo método es mucho más rápido, eficaz y selectivo.